

JP 2004-177180 A 2004.6.24

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-177180

(P2004-177180A)

(43) 公開日 平成16年6月24日(2004.6.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (番号)
GO 1 N 30/60	GO 1 N 30/60	B
GO 1 N 30/26	GO 1 N 30/26	P
GO 1 N 30/48	GO 1 N 30/48	G
// GO 1 N 30/34	GO 1 N 30/48	Y
GO 1 N 30/72	GO 1 N 30/34	E

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-341409 (P2002-341409)  
 (22) 出願日 平成14年11月25日 (2002.11.25)

(71) 出願人 000173566  
 財団法人化学物質評価研究機構  
 東京都文京区後馬 1-4-2 S  
 (74) 代理人 100083688  
 弁護士 高岡 靖世  
 (72) 発明者 田嶋 晴彦  
 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野 1600 財  
 団法人化学物質評価研究機構 東京事業所  
 内  
 (72) 発明者 赤星 竹男  
 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野 1600 財  
 団法人化学物質評価研究機構 東京事業所  
 内

最終頁に続く

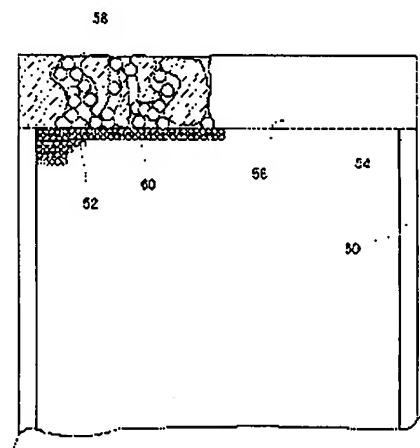
(54) 【発明の名称】 液体クロマトグラフ用カラム

## (57) 【要約】

【課題】 目詰りが少なく、多量の試料液を注入することのできる LC 用カラムを提供する

【解決手段】 充填剤 52 を内部に充填した円筒状カラム主体 50 と、前記カラム主体の両端に取りつけたエンドフィッティングとからなる液体クロマトグラフ用カラムのエンドフィッティングがその内部の溶離液流路に多孔性フィルタ 56 を介装すると共に前記多孔性フィルタの細孔 58 内に充填粒子 60 を充填した液体クロマトグラフ用カラム。充填粒子の粒径は、カラム主体に充填する充填剤の粒径よりも大きいことが好ましい。

【選択図】 図 1



(2)

JP 2004-177180 A 2004.6.24

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

充填剤を内部に充填した円筒状カラム主体と、前記カラム主体の両端に取りつけたエンドフィッティングとからなる液体クロマトグラフ用カラムにおいて、前記エンドフィッティングがその内部の溶離液流路に多孔性フィルタを介装すると共に前記多孔性フィルタの細孔内に充填粒子を充填してなることを特徴とする液体クロマトグラフ用カラム。

## 【請求項 2】

多孔性フィルタの細孔内に充填する充填粒子の粒径が、カラム主体に充填する充填剤の粒径よりも大きい請求項 1 に記載の液体クロマトグラフ用カラム。

## 【請求項 3】

充填粒子が逆相クロマトグラフィー用充填剤である請求項 1 に記載の液体クロマトグラフ用カラム。

## 【請求項 4】

カラム主体が、カラムの入口側から出口側に向けてカラム主体全長の 40% 以下に逆相用クロマトグラフィー充填剤を充填した濃縮部と、残りのカラム主体内に前記濃縮部に充填した充填剤よりも単位体積当りの液相量が多い逆相クロマトグラフィー用充填剤を充填してなる分離部とを有する請求項 1 に記載の液体クロマトグラフ用カラム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、高速液体クロマトグラフ（LC）用カラムに関し、特に液体クロマトグラフー質量分析計（以下 LC/MS）等を使用して好適な液体クロマトグラフ用カラムに関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

近年、内分泌機乱物質の調査、研究、医薬品の開発等の、生物関連分野において LC/MS が急速に普及している。図 6 は、非特許文献 1 に記載された従来の LC 用カラムの構造例を示すものである。図 6 中、100 は、カラム主体で、円筒状のステンレススチール製パイプ 2 中に充填剤 4 が充填されている。前記カラム主体 100 の両端には、エンドフィッティング 200 a、200 b が取り付けられ、これによりカラム主体 100 と、入口側キャピラリー 6 a、出口側キャピラリー 6 b とが連結されている。

## 【0003】

前記フィッティング 200 a、200 b は、フィッティング部材 8 a、8 b 内にパイプ 2 の各端部を挿入し、大径フェラル 10 a、10 b を大径袋ナット 12 a、12 b で締付けることにより、カラム主体 100 の両端部とフィッティング部材 8 a、8 b とを液密に連結させる構造になっている。

## 【0004】

同様に、キャピラリー 6 a、6 b も小径フェラル 14 a、14 b を介して押しねじ 16 a、16 b によりフィッティング部材 8 a、8 b に液密に連結される。

## 【0005】

前記フィッティング部材 8 a、8 b と、カラム主体 100 の両端との間には、多孔性のフィルタ 18 a、18 b が介装されている。

## 【0006】

この LC カラムを用いて高速液体クロマトグラフ分析を行う場合は、キャピラリー 6 a を通って圧送される溶離液はエンドフィッティング内に形成された溶離液流路に介装された前記フィルタ 18 a の多孔を通してカラム主体 100 内に供給され、分析対象の各成分をここで分離しながらカラム主体 100 内を通過した後、フィルタ 18 b に形成された多孔を通してキャピラリー 6 b に送られる。フィルタ 18 a は、溶離液中に存在する微粒子がカラム主体 100 内に流入することを防止する濾材の役割を果たす。

## 【0007】

(3)

JP 2004-177180 A 2004.6.24

LCカラムは、一定の期間使用すると、溶離液や試料溶液中に混入している微粒子がLCカラム入口側のフィルタ近傍に詰り、その結果LCカラムに送液される溶離液の圧送圧力の上昇、理論段数の低下を来す。

【0008】

LC/MSに用いるLCカラムは、溶離液流量を小さくするため、通常のLC用カラムの内径(4~6mm)と比較して小さいセミマイクロカラム(内径が2.1mmや1.5mm)が通常用いられている。セミマイクロカラムは通常のカラムと比較し、カラム断面積が1/5~1/10であり、溶離液流量は、通常0.1~0.2ml/min程度である。

【0009】

従来のセミマイクロカラムを用いるLC/MS分析においては、高感度を得るために試料注入量を50~100 $\mu$ lとする場合がある。この場合、注入した全試料がカラムに流入する時間は計算上30~60秒になる。従って、50~100 $\mu$ lの試料をセミマイクロカラムに注入する場合は、得られるピークは幅が広がっている。

【0010】

このように、セミマイクロカラムには、試料注入量が小さい問題や、溶離液入口側のフィルタ近傍が溶離液中の微粒子により詰り易く、耐久性に劣る問題がある。

【0011】

【非特許文献1】

最新高速液体クロマトグラフィー 南原利夫ら、廣川書店、平成3年11月25日出版、p. 228

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、上記問題を解決するため種々検討するうちに、多孔質フィルタの孔内にLCカラムに充填する充填剤を圧入すると、溶離液中の微粒子によるフィルタ近傍の詰りを効果的に減少させ得ることを見いだした。更に、カラム主体の溶離液入口側に単位体積当りの液相量の少ない充填剤を、出口側に単位体積当りの液相量が多い充填剤を充填することにより、多量の試料液量を注入できることを見いだした。従って本発明の目的とするところは、目詰りが少なく、多量の試料液量を注入することのできるLC用カラムを提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成する本発明は、以下に記載するものである。

【0014】

〔1〕 充填剤を内部に充填した円筒状カラム主体と、前記カラム主体の両端に取りつけたエンドフィッティングとからなる液体クロマトグラフ用カラムにおいて、前記エンドフィッティングがその内部の溶離液流路に多孔性フィルタを介装すると共に前記多孔性フィルタの細孔内に充填粒子を充填してなることを特徴とする液体クロマトグラフ用カラム。

【0015】

〔2〕 多孔性フィルタの細孔内に充填する充填粒子の粒径が、カラム主体に充填する充填剤の粒径よりも大きい〔1〕に記載の液体クロマトグラフ用カラム。

【0016】

〔3〕 充填粒子が逆相クロマトグラフィー用充填剤である〔1〕に記載の液体クロマトグラフ用カラム。

【0017】

〔4〕 カラム主体が、カラムの入口側から出口側に向けてカラム主体全長の40%以下に逆相用クロマトグラフィー充填剤を充填した濃縮部と、残りのカラム主体内に前記濃縮部に充填した充填剤よりも単位体積当りの液相量が多い逆相クロマトグラフィー用充填剤を充填してなる分離部とを有する〔1〕に記載の液体クロマトグラフ用カラム。

【0018】

【発明の実施の形態】

(4)

JP 2004-177180 A 2004.6.24

図1は、本発明の液体クロマトグラフ用カラムのカラム主体の端部側の一例を示す拡大断面図である。

【0019】

図1において、50はカラム主体で、その内部に同一種類の充填剤52が均一に充填されている。カラム主体50は、ステンレスや、ガラス製の円筒形で、通常の高速液体クロマトグラフ用カラムに使用されているものがそのまま使用できる。これらのカラム主体は、通常内径4～6mm、長さ10～50cm程度のものが多い。また、内径が3～1mm、長さ3～15cmのセミマイクロカラム用のカラム主体も使用できる。

【0020】

なお、後述するように、カラム主体50内には、2種類の充填剤をカラム本体50の長さ10方向に沿って2層に積重ねて充填しても良い。

【0021】

カラム主体50に充填する充填剤は、高速液体クロマトグラフィーにおいて使用されている充填剤の何れも使用できる。具体的には、シリカゲル粒子の表面にオクチル基、オクタデシル基等の炭素数3～24のアルキル基を化学結合させた逆相型、グリシジルエーテル基等の極性基を化学結合させた順相型、シリカゲルや多孔性樹脂を用いるゲル濾過型等の充填剤が例示される。これらの充填剤は、粒径が1～20 $\mu$ m程度のものが多い。

【0022】

前記カラム主体50の一端54には、カラム主体50と略同一直径の円盤状フィルタ56が設置されている。前記フィルタ56は、ステンレス、テフロン（登録商標）等の材料で20製造された多孔性円盤で、その内部には細孔58を多数有する。このフィルタは、市販品が特に制限無く使用できる。

【0023】

前記細孔58内には、充填粒子60が多数充填されている。充填粒子は、前記充填剤52よりも平均粒径が大きいものが好ましく、充填剤52の平均粒径の2～5倍程度のものがより好ましい。

【0024】

充填粒子60の形状は特に制限が無く、球形、楕円球、特定の形状のない無定型等の何れの形状でも良いが、球形が特に好ましい。充填粒子60の材質としては、カラムの分離に30悪影響を与えることがなければ、何れの材質のものでも使用できる。分離に影響を与えず、入手が容易な点から、シリカが好ましい。シリカをシラン処理した物、又はカラム本体に充填する充填剤であって平均粒径の大きい充填剤を充填粒子として使用する場合は、これらは不活性化処理されているので、特に好ましい。

【0025】

フィルタ56の細孔58内に充填粒子を充填する方法は特に制限がないが、フィルタ56の溶離液流入側表面から充填粒子をフィルタ56に擦りつけたり、充填粒子を懸濁させた溶媒を圧送する等の方法により簡単に充填できる。細孔58の径はフィルタ56内部で大きく変動しており、20 $\mu$ m以上の細孔径の部分や、数 $\mu$ m以下の細孔径の箇所がある。このため、細孔58内に充填された粒子は、細孔58内の狭い箇所等で細孔を塞ぎ、内部に40保持される。

【0026】

細孔内は前記充填粒子60により塞がれるが、カラム本体50に送られる溶離液は充填粒子60間や、充填粒子60と細孔壁との間隙を通過して、自由に細孔内を流れることができる。

【0027】

本液体クロマトグラフ用カラムは、クロマトグラフ分析中にカラムに溶離液が流入する際、溶離液に分散している不純物粒子（微細なゴミ等であって通常充填粒子よりも粒径が小さい）が細孔壁と充填粒子との間、または充填粒子間で捕集される。このため、不純物粒子はフィルタ56を通り抜けてカラム本体に流入しにくい。この場合、不純物粒子の捕集はフィルタ56の細孔58内の各部分で起るので、長期間にわたりフィルタ56の全体が50

(5)

JP 2004-177180 A 2004.6.24

不純物粒子により閉塞され難い。

【0028】

その結果、本カラムは長期間使用しても、不純物粒子によるカラムの目詰りが防止され、目詰りによる溶離液の送液圧力上昇が少ない。

【0029】

これに対し、従来のカラムは、フィルタの細孔を通過した不純物粒子が、カラム本体に充填した充填剤の表面で全て捕集されるので、比較的短時間にカラムが目詰りする。

【0030】

図2は、LC/MS用カラムとして好適なカラム構成を示す説明図である。LC/MSに使用されるカラムは、MSに大量の溶離液が流入しないように、汎用カラムよりも小型の 10  
セミマイクロカラムが一般的である。

【0031】

この例においては、セミマイクロカラム主体70内に、2種類の充填剤が充填され、濃縮部72と、分離部74とが形成されている。尚、このカラム主体70の両端は、図1を用いて詳述した本発明に係るエンドフィッティング（不図示）が取り付けられている。

【0032】

前記濃縮部72はカラムの入口側から出口側に向けて（矢印P方向）、カラム主体70の全長（A+B）の40%以下の長さAで形成されている。

【0033】

濃縮部72に充填される充填剤は逆相クロマトグラフィー用の前記充填剤が充填されてい 20  
る。

【0034】

分離部74には、前記濃縮部72に充填されている充填剤よりも単位体積当りの液相量が多い逆相クロマトグラフィー用充填剤が充填されている。濃縮部72に充填されている充填剤の単位体積当りの液相量に対する、分離部74に充填されている充填剤の単位体積当りの液相量の割合は、1.5～10倍が好ましく、2～4倍がより好ましい。液相量の相違は、化学的に同一種類の液層であってその化学結合量が異なる充填剤の組合わせであっても良い。また、シリカ粒子に結合している液層（アルキル基）が異なり、アルキル基の炭素数が異なることにより、結果として液相量が異なる充填剤の組合わせであっても良い 30  
。このような例としては、プロピル基やオクチル基をシリカゲルに結合した充填剤を濃縮部に、オクタデシル基を同一のシリカゲルに結合した充填剤を分離部に充填する組合わせがある。

【0035】

このカラムに100 $\mu$ l程度の大液量の分析試料を注入し、LC/MS分析をする場合につき説明する。この場合、有機溶媒濃度が低い溶離液から有機溶媒濃度を連続的に又は段階的に高めていくグラジエント溶出法を用いる。

【0036】

まず、図2に示す構成のカラム主体を有するカラムに大量の試料を注入すると、溶離液中の有機溶媒濃度が低いので、カラムの濃縮部72において試料成分が弱く保持される。試料を溶解している試料溶媒は溶離液と共にカラム内をカラム出口側に移動する。これにより、試料成分と、試料を溶解している試料溶媒とが分離される。その後、試料成分はより 40  
保持力の強い分離部74の先端に到達し、この先端で濃縮されピーク幅が狭い状態で保持される。

【0037】

その後、溶離液の有機溶媒濃度を高める（グラジエント溶出）ことにより、先端に濃縮された試料がカラム内を移動しながら更に各試料成分に分離され、狭いピーク幅を保持した状態でカラム出口側から溶出する。溶出した各試料成分は、MSにより、各成分が検出される。

【0038】

本発明カラムは、上記グラジエント溶出法を適用することにより、試料を大量に注入した 50

(6)

JP 2004-177180 A 2004.6.24

場合もピーク幅を広げることなく高感度分析を可能とする。

【0039】

【実施例】

実施例1

長さ15cm、内径2.1mmのステンレススチール製カラム本体に、表1に示す2種類の充填剤を充填し、濃縮部、分離部を形成した。カラム本体の両端に、充填粒子を擦込んだフィルタをエンドフィッティングで取り付け、セミマイクロカラムを得た（実施カラム1）。

【0040】

濃縮部長さA=2cm、分離部長さB=13cmとした。濃縮部に充填した充填剤は、球状シリカゲル表面にオクチル基を化学結合した粒径5 $\mu$ mのもので、炭素含有率9質量%のものであった。

【0041】

分離部に充填した充填剤は、同じ球状シリカゲル表面にオクタデシル基を化学結合させた粒径5 $\mu$ mのもので、炭素含有率17質量%のものであった。

【0042】

フィルタの平均細孔径は20~30 $\mu$ m程度であり、細孔に擦込んだ充填粒子は、粒径10 $\mu$ mの球状シリカゲル表面にオクタデシル基を化学結合させたもので、炭素含有率は17質量%であった。

【0043】

比較例1

実施例1で用いたカラム本体に、実施例1の分離部に充填した充填剤のみを充填した。カラム本体の両端に、充填粒子を擦込んでいないフィルタをエンドフィッティングで取り付け、セミマイクロカラムを得た（比較カラム1）。

【0044】

なお、実施カラム1の理論段数は12000、比較カラム1の理論段数は12500であり、大差はなかった。

【0045】

検討例1

0.45 $\mu$ mのフィルタで濾過した緑茶抽出水をLCに取りつけた上記実施カラム1、比較カラム1のそれぞれに100回連続して注入した。

【0046】

LC運転条件は、溶離液が水/アセトニトリル(ACN)=40/60(容積基準)で、溶離液送液量0.15ml/min、温度40℃であった。

【0047】

図3に、注入回数と溶離液圧送用ポンプ圧力との関係を示した。比較カラム1は注入100回で、圧力が約3倍に上昇した。これに対し、実施カラム1は、殆ど圧力上昇がなかった。これは、実施カラム1の場合、フィルタに充填粒子が充填してあるので、緑茶成分に含まれる微細粒子がフィルタ全体に分散して捕捉されたことによると考えられる。

【0048】

検討例2

実施カラム1、比較カラム1を用いてLC分析を行い、大量試料注入の際の両カラムの理論段数を比較した。

【0049】

試料は、種々の比率の水/アセトニトリル混合溶媒にナフタレンを濃度20ng/mlになるように溶解した。試料注入量は100 $\mu$ l、カラム温度は40℃、溶離液流量は0.15ml/minであった。溶離条件は、アセトニトリル濃度10%から6分間かけて直線的にアセトニトリル濃度80%にし、その後6分間同濃度を保持するものであった。

【0050】

表1に、結果を示した。実施カラム1の場合、100 $\mu$ lの大量注入の場合も、高い理論

(7)

JP 2004-177180 A 2004.6.24

段数が保持できた。

【0051】

【表1】

表1

混合溶媒中のACN濃度 (容量%)	50	60	70	80
実施カラム1の理論段数	89800	56400	24000	-
比較カラム1の理論段数	71500	38600	22700	-

10

- : 測定不能

図4に、混合溶媒中のACN濃度が80容量%の試料を注入したときに得られたクロマトグラムを示した。比較カラム1のクロマトグラムにおいては、ナフタレンのピーク形状が変形している。これに対し、実施カラム1のクロマトグラムは鋭いナフタレンピークを示している。

【0052】

検討例3

分析試料に、ビタミンA、ビタミンAアセテートを用いて検討例2と同様の大量試料注入を行った。試料濃度は $1\mu\text{g}/\text{ml}$ アセトニトリルで、この $100\mu\text{l}$ をLCに注入した。溶離液流量は $0.15\text{ml}/\text{min}$ で、溶液組成はメタノール80/水20（容量基準）から、メタノール100%まで直線的にメタノール濃度を上昇させた。

【0053】

得られたクロマトグラムを図5に示した。実施カラム1を用いた場合、得られるピーク形状は鋭い。これに対し、比較カラム1を用いた場合、得られるピークの形状は大きく崩れている。

【0054】

【発明の効果】

本発明のカラムは、フィッティングに取りつけたフィルタの細孔内に充填粒子を充填しているので、長期間に亘り溶離液中の微粒子に起因する溶離液の送液圧力上昇が小さい。また、カラム主体中に、単位体積当りの液相量の異なる充填剤を2層に分けて充填する場合は、試料の大量注入を行うことができ、このカラムは特にLC/MS用セミマイクロカラムとして有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の液体クロマトグラフ用カラムのフィルタ部分を示す拡大断面説明図である

【図2】本発明の液体クロマトグラフ用カラムのカラム主体の構成の一例を示す断面図である。

【図3】溶離液の送液圧力と注入回数との関係を示すグラフである。

【図4】大量注入した場合のピークの形状の相違を示すクロマトグラムである。

【図5】大量注入した場合のピークの形状の相違を示すクロマトグラムである。

【図6】従来の液体クロマトグラフ用カラムの構成を示す断面図である。

【符号の説明】

100 カラム主体

2 バイブ

50

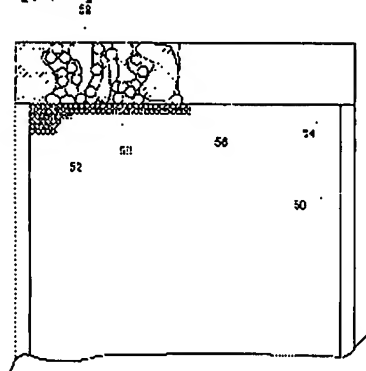
(8)

JP 2004-177180 A 2004.6.24

- 4 充填剤  
 200 a、200 b エンドフィッティング  
 6 a 入口側キャピラリー  
 6 b 出口側キャピラリー  
 8 a、8 b フィッティング部材  
 10 a、10 b 大径フェラル  
 12 a、12 b 大径袋ナット  
 14 a、14 b 小径フェラル  
 16 a、16 b 押しねじ  
 18 a、18 b フィルタ  
 50 カラム主体  
 52 充填剤  
 54 一端  
 56 フィルタ  
 58 細孔  
 60 充填粒子  
 70 セミマイクロカラム主体  
 72 濃縮部  
 74 分離部

10

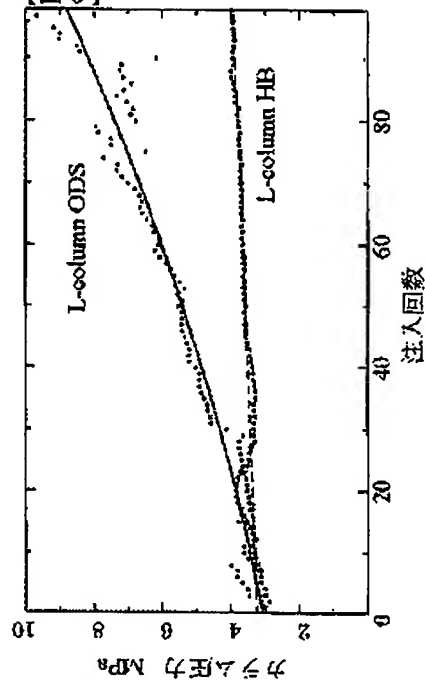
【図 1】



【図 2】



【図 3】

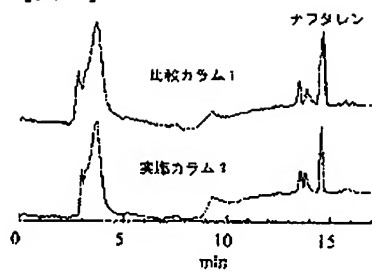




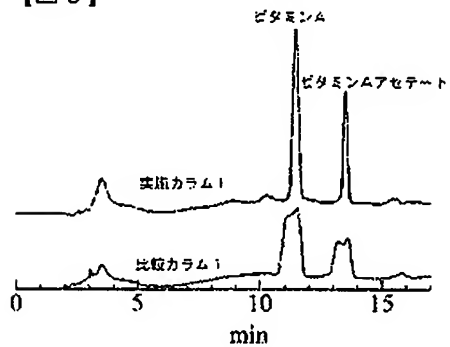
(9)

JP 2004-177180 A 2004.6.24

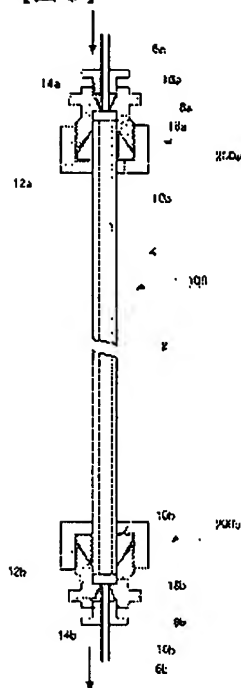
【図 4】



【図 5】



【図 6】



(10)

JP 2004-177180 A 2004.6.24

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

ターマコード(参考)

G 0 1 N 30/88

G 0 1 N 30/72

C

G 0 1 N 30/88

E

(72)発明者 坂牧 寛

埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野 1 6 0 0 財団法人化学物質評価研究機構 東京事業所内